

葛根芩连汤三氯甲烷提取物缓解伊立替康所致肠毒性的作用机制分析

吴亿晗¹, 成颜芬¹, 王迪¹, 杨晓琴¹, 钟雪梅¹, 林洁¹, 傅超美¹, 章津铭^{1*}, 胡一晨^{2*}
(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 成都大学食品与生物工程学院, 成都 610106)

[摘要] 目的: 基于经典名方葛根芩连汤“解表清里、主协热下利”的功效, 制备葛根芩连汤三氯甲烷提取物用于缓解伊立替康所致的肠毒性, 为经典名方葛根芩连汤的开发与应用提供实验依据。方法: 60只小鼠随机分为正常组、模型组、洛哌丁胺组(阳性药盐酸洛哌丁胺胶囊, 0.4 mg·kg⁻¹)和葛根芩连汤三氯甲烷提取物高、低剂量组(2.3, 1.16 g·kg⁻¹)。采用盐酸伊立替康(CPT-11, 剂量 55 mg·kg⁻¹)连续 4 d 腹腔注射制备小鼠迟发性腹泻模型, 正常组注射等体积生理盐水; 分别于第 5 天灌胃给予相应药物, 正常组和模型组给予相应体积蒸馏水, 连续给药 5 d。观察各组小鼠的一般情况, 计算腹泻指数。运用苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠结肠组织病理变化, 按试剂盒说明书检测结肠组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素- 1β (IL- 1β), 环氧合酶-2(COX-2), 细胞间黏附分子-1(ICAM-1), 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px), 超氧化物歧化酶(SOD), 丙二醛(MDA), 一氧化氮(NO)的含量。同时, 采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组小鼠结肠组织的Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Keap1), 核转录因子E₂相关因子2(Nrf2), 紧密连接蛋白-1(ZO-1), 血红素氧合酶-1(HO-1), 紧密连接蛋白(Occludin)表达情况。结果: 与正常组比较, 模型组经腹腔注射CPT-11造模后小鼠体质量显著降低($P < 0.01$), 腹泻指数显著升高($P < 0.01$), 结肠组织中TNF- α , IL- 1β , COX-2, ICAM-1, MDA, NO含量显著升高($P < 0.01$), GSH-Px, SOD显著降低($P < 0.01$); HE染色显示, 模型组小鼠结肠可见大量炎性细胞, 结肠黏膜可见缺损、肿胀、出血及炎性渗出; 结肠组织Keap1, Nrf2, ZO-1, HO-1与Occludin蛋白表达水平均显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较, 洛哌丁胺组和葛根芩连汤三氯甲烷提取物高、低剂量组可缓解小鼠体质量降低, 且腹泻指数明显下降; TNF- α , IL- 1β , COX-2, ICAM-1, MDA, NO水平降低, GSH-Px和SOD含量显著上升; HE染色显示, 葛根芩连汤三氯甲烷提取物高、低剂量组细胞紧密排列, 胞核清晰; 结肠组织屏障功能相关蛋白Keap1, Nrf2, HO-1, Occludin, ZO-1表达升高。结论: 葛根芩连汤三氯甲烷提取物可能通过调节炎症及氧化应激来增强肠道屏障功能, 进而缓解CPT-11所致迟发性腹泻, 可为中药缓解化疗药物的毒副作用提供参考, 并且为经典名方的开发提供依据。

[关键词] 葛根芩连汤; 盐酸伊立替康(CPT-11); 肠毒性; 氧化应激; 炎症; 迟发性腹泻; 洛哌丁胺; 肿瘤

[中图分类号] R22; R28; R96; R73 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)16-0016-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210577

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210202.1454.004.html>

[网络出版日期] 2021-02-03 9:22

Analysis of Mechanism of Chloroform Extract of Gegen Qinliantang on Alleviating Enterotoxicity Induced by Irinotecan

WU Yi-han¹, CHENG Yan-fen¹, WANG Di¹, YANG Xiao-qin¹, ZHONG Xue-mei¹, LIN Jie¹,
FU Chao-mei¹, ZHANG Jin-ming^{1*}, HU Yi-chen^{2*}

(1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;
2. College of Food and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China)

[收稿日期] 20201217(012)

[基金项目] 四川省科技支撑计划项目(2020YJ0195); 成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划项目; 四川省科技创新苗子工程项目(2019051)

[第一作者] 吴亿晗, 在读博士, 从事中药新制剂研究与开发, E-mail: yihanwuone@126.com

[通信作者] * 章津铭, 教授, 从事中药新剂型与新制剂研究, E-mail: edutcmzm@126.com;

* 胡一晨, 副教授, 从事中药质量控制及其药效活性研究, E-mail: 20122071@cdutcm.edu.cn

[Abstract] **Objective:** Considering the efficacy of Gegen Qinliantang (GQT) in releasing exterior and clearing interior to alleviate dampness-heat dysentery, we analyzed the mechanism of the chloroform extract of GQT in alleviating enterotoxicity caused by irinotecan to provide an experimental basis for the development of GQT. **Method:** Kunming mice ($n=60$) were randomly divided into a blank group, a model group, a loperamide group (positive drug of loperamide hydrochloride capsule, $0.4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and high- ($2.3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and low-dose ($1.16 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) GQT chloroform extract groups. The mouse model of delayed diarrhea was established by intraperitoneal injection of irinotecan hydrochloride (CPT-11, $55 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) for four consecutive days, meanwhile, the mice in the blank group only received the same volume of normal saline. Corresponding drugs were administered by gavage on the fifth day, respectively, while the ones in the blank group and model group were given distilled water for five consecutive days. The general condition of mice in each group was observed, and diarrhea indexes of mice were recorded. Pathological changes in colon tissues of mice were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)- 1β , cyclooxygenase (COX)-2, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) levels in colon tissues were detected with the assay kits. Furthermore, the expression levels of Kelch sample epoxy chloropropane associated protein 1 (Keap1), nuclear factor E₂ related factor 2 (Nrf2), tight junction protein-1 (ZO-1), heme oxygenase-1 (HO-1) and tight junction protein (Occludin) were detected by Western blot. **Result:** Compared with the blank group, the model group showed declined body weight and reduced contents of GSH-Px and SOD ($P<0.01$), whereas increased diarrhea indexes and TNF- α , IL- 1β , COX-2, ICAM-1, MDA and NO levels ($P<0.01$). Abundant inflammatory cells and colonic mucosa with defects, swelling, bleeding, and inflammatory exudation were revealed by HE staining in the mice of the model group. The expression levels of Keap1, Nrf2, ZO-1, HO-1 and Occludin in colon tissues significantly declined ($P<0.01$). Compared with the model group, the loperamide group and the high- and low-dose GQT chloroform extract groups exhibited improved weight loss, reduced diarrhea indexes, diminished TNF- α , IL- 1β , COX-2, ICAM-1, MDA and NO, and elevated GSH-Px and SOD. HE staining indicated that the cells were compactly arranged with clear nuclei in the high- and low-dose GQT chloroform extract groups, and the expression levels of Keap1, Nrf2, HO-1, Occludin, and ZO-1 were up-regulated. **Conclusion:** GQT chloroform extract may alleviate CPT-11-induced delayed diarrhea by regulating inflammation and oxidative stress for enhancing the intestinal barrier function. These findings are expected to provide a reference for exploring the toxicity-attenuating effect of Chinese medicinals on chemotherapy drugs and for developing famous classical formulas.

[Keywords] Gegen Qinliantang; irinotecan hydrochloride (CPT-11); enterotoxicity; oxidative stress; inflammation; delayed diarrhea; loperamide; tumor

盐酸伊立替康(CPT-11)是半合成水溶性羟基喜树碱类天然抗肿瘤药物,为结直肠癌治疗的一线药物^[1-2]。但在其应用过程中以迟发性腹泻为主的剂量限制性肠道毒性发生率高达90%,并且约20%的患者使用CPT-11后会产生3~4级腹泻,从而导致化疗中止,进程推迟,甚至引起自身水电解质紊乱而死亡,严重影响了治疗效果和患者生存质量^[3]。目前,西医对CPT-11所致迟发性腹泻尚无明确有效的治疗手段,临床常用洛哌丁胺、奥曲肽、醋托啡烷、布地奈德等药物,通过抑制胃肠道蠕动、碱化肠道并降低肠道酶活性,从而减少迟发性腹泻的发

生^[4-6],但这些药物易产生副作用,且对抗迟发性腹泻的疗效较差。如何防治CPT-11所致的肠毒性已成为国内外研究的难点和热点。

近年来,中医药在防治化疗药物引起的毒副作用方面优势逐渐凸显,耶鲁大学郑永齐教授团队历经十余年系统研究,提出黄芩汤提取物PHY906可有效减少CPT-11化疗引起的胃肠道毒性,并有望被美国食品药品监督管理局(FDA)批准^[7]。葛根芩连汤由葛根、黄芩、黄连、炙甘草4味中药材组成,专解阳明之肌表,兼清胃中之里热,与黄芩汤、白头翁汤并称为《伤寒论》中“清大肠热”治疗泄泻、痢疾的

“三大经典名方”。相较于黄芩汤,葛根芩连汤重用葛根,葛根甘、辛而凉,其性清轻升发,入脾、胃、肺经,既能解表退热,又能升发脾胃清阳之气而治下利;臣以苦寒的黄芩、黄连,清热燥湿、直清里热,还可厚胃肠,坚阴止利;佐以炙甘草甘缓和中,调和诸药^[8-9]。临床研究显示,葛根芩连汤可有效用于急慢性肠炎、细菌性痢疾、病毒性腹泻等^[10-12]。本课题组前期研究发现,葛根芩连汤可有效缓解CPT-11所致的小鼠肠毒性^[13],但其物质基础和作用机制有待进一步研究。故本研究采用液-液萃取法制备葛根芩连汤三氯甲烷提取物,通过观察该提取物对动物腹泻率、结肠组织炎症因子水平及肠上皮细胞屏障蛋白表达等作用,探究其缓解CPT-11所致肠毒性的效果及相关作用机制,为中药缓解化疗药物不良反应提供实验依据。

1 材料

RM2016型病理切片机(上海徕卡显微系统股份有限公司),KD-P型组织摊片机(广东科迪仪器设备有限公司),Eclipse E100型正置光学显微镜和DS-U3型成像系统(日本尼康公司),Mini Protean 3 cell型电泳仪(美国Bio-Rad公司),TE77XP型电环仪(美国Hoefer公司),MK3型酶标仪(芬兰雷勃集团公司)。

CPT-11(大连美仑生物技术有限公司,批号NO402A),盐酸洛哌丁胺胶囊(西安杨森制药有限公司,批号190305883,国药准字H10910085,规格为2 mg/粒);肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素- 1β (IL- 1β),环氧合酶-2(COX-2),细胞间黏附分子-1(ICAM-1),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA),一氧化氮(NO)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20190306,20190302,20190306,20190318,20190320,20190317,20190326,20190303);兔多克隆抗体Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Keap1),核转录因子E₂相关因子2(Nrf2),紧密连接蛋白(Occludin),血红素氧合酶-1(HO-1)(英国Abcam公司,批号分别为ab139729,ab137550,ab167161,ab68477);小鼠单克隆抗体紧密连接蛋白-1(ZO-1)[圣克鲁斯生物技术(上海)有限公司,批号sc-10804],二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量分析试剂盒[赛默飞世尔科技(上海)有限公司,批号PICP123223],苏木素染液(武汉谷歌生物科技有限公司,批号G1005),RIPA裂解液(北京索莱宝科技有限公司,批号R0020),兔多克隆抗体甘油醛-3-磷

酸脱氢酶(GAPDH,武汉赛维尔生物科技有限公司,批号LS203560),辣根过氧化物酶(HRP)羊抗兔标记二抗(上海碧云天生物技术有限公司,批号A0208)。所有饮片均购于成都荷花池中药材市场,经成都中医药大学蒋桂华教授鉴定,葛根为豆科植物野葛*Pueraria lobata*的干燥根,黄芩为唇形科植物黄芩*Scutellaria baicalensis*的干燥根,黄连为毛茛科植物黄连*Coptis chinensis*的干燥根茎,炙甘草为豆科植物甘草*Glycyrrhiza uralensis*的干燥根和根茎的炮制加工品。

60只昆明种小鼠,体质量(25±2)g,雌雄各半,购自成都达硕实验动物有限公司,合格证号SCXK(川)2015-030。本研究所涉及的动物实验经成都中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准号2014DL-023。

2 方法

2.1 葛根芩连汤三氯甲烷提取物的制备

《伤寒论》中记载葛根芩连汤为“葛根半斤,甘草二两(炙),黄芩三两,黄连三两。”根据文献查阅对葛根芩连汤进行度量衡考证,班固《汉书·律历志》中记载汉代“十六两为斤”^[14-15];仝小林等^[16]对《伤寒论》中药物剂量进行考证,认为“《伤寒论》经方1两约合今称15.625g(简为15.6g)”^[17];杜茂波^[17]对《伤寒论》涉及的剂量单位进行探讨,明确了《伤寒论》中剂量单位与现代剂量的换算关系,即一两为15.625g。根据古方记载及剂量考证,选择葛根芩连汤现代剂量为葛根125g,炙甘草31.25g,黄芩46.875g,黄连46.875g,葛根-炙甘草-黄芩-黄连用量比8:2:3:3,全方合250g。

本实验根据后续动物实验药物灌胃剂量换算及三氯甲烷提取物得率进行折算,遵照葛根芩连汤古方记载剂量换算原则,分别称取葛根1kg,甘草250g,黄芩375g,黄连375g。遵照古法“先煎葛根”,并参考《医疗机构中药煎药室管理规范》《中药饮片标准汤剂(第一卷)》^[18],再结合预试验考察,最终确定葛根芩连汤制备方法为以上4味药,取葛根加入15倍量水先浸泡30min,煎煮1h后加入其他药味共同煎煮1h,滤过;药渣再加10倍量水煎煮1.5h,滤过;合并2次煎液,减压浓缩至药液生药质量浓度为0.5g·mL⁻¹(体积4L)。采用系统溶剂法,加入浓缩液3倍量的三氯甲烷进行萃取,重复3次,合并三氯甲烷萃取液,减压浓缩干燥,得葛根芩连汤三氯甲烷提取物。

2.2 动物分组、造模及给药

将60只小鼠随机等

分为正常组、模型组、洛哌丁胺组和葛根芩连汤三氯甲烷提取物高、低剂量组,每组12只。除正常组外,其他组小鼠均以 $55\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射CPT-11,连续注射4 d,每天1次,制备CPT-11所致迟发性腹泻小鼠模型^[19],正常组注射等量生理盐水。在第5天,采用无菌生理盐水配制盐酸洛哌丁胺混悬液进行洛哌丁胺组小鼠灌胃(给药剂量 $0.4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),葛根芩连汤三氯甲烷提取物高、低剂量组小鼠分别按2.3, 1.16 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃给予葛根芩连汤三氯甲烷提取物,正常组和模型组灌胃等量蒸馏水,持续给药5 d,每天1次,至第9天断颈处死小鼠,同时取结肠组织,用于后续检测。

2.3 动物评价指标的检测

2.3.1 一般情况 给药期间每天观察小鼠的一般状况(精神状况、毛发色泽、肛门颜色等),每天固定早上9:00称量小鼠体质量。

2.3.2 腹泻评分 将小鼠置于代谢笼正常饲养,笼中铺有滤纸以观察大便情况,每日观察2次。腹泻程度根据文献^[20]标准进行评分,即0分,大便正常或没有;1分,轻度腹泻,大便可见轻微湿软;2分,中度腹泻,大便较湿且不成型,并且有轻度肛周着色;3分,重度腹泻,水样便并伴有重度肛周着色。

2.3.3 苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠结肠组织病理形态学变化及组织损伤学评分 将结肠组织用生理盐水冲洗干净,置于4%多聚甲醛溶液中固定,经组织常规脱水、浸蜡和石蜡包埋,4 μm 厚度切片后进行HE染色,利用光学显微镜观察小鼠结肠组织形态学变化;结合炎症、病变深度、隐窝破坏及病变范围进行组织损伤学评分^[21]。炎症严重程度评分:无,0分;轻度,1分;中度,2分;重度,3分。病变深度评分:无,0分;黏膜下层,1分;肌层,2分;浆膜层,3分。隐窝破坏评分:无,0分;基底1/3隐窝被破坏,1分;基底2/3被破坏,2分;仅有完整表面上皮,3分;全部隐窝和上皮被破坏,4分。病变范围评分:

1%~25%,1分;26%~50%,2分;51%~75%,3分;76%~100%,4分。

2.3.4 小鼠结肠组织中生化指标水平的检测 各组小鼠结肠组织用磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)进行匀浆处理,匀浆液于4 $^{\circ}\text{C}$, 4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min(离心半径8 cm),取上清液,按试剂盒说明书进行操作,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定TNF- α , IL-1 β , COX-2, ICAM-1含量;比色法测定GSH-Px, NO的含量;水溶性四氮唑(WST-1)法检测SOD的含量;硫代巴比妥酸(TBA)法检测MDA的含量。

2.3.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠结肠组织中Keap1, Nrf2, ZO-1, HO-1和Occludin蛋白的表达 采用RIPA裂解液提取小鼠结肠组织总蛋白,BCA试剂盒测定蛋白浓度,加上样缓冲液在干式恒温仪内使蛋白变性。于120 V恒压电泳1 h,于70 mV恒压转膜70 min。用5%脱脂奶粉封闭1 h,加入一抗Keap1(1:1 000), Nrf2(1:1 000), ZO-1(1:800), HO-1(1:2 000), Occludin(1:2 000)和内参GAPDH(1:1 500)置于摇床4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,加入二抗HRP(1:1 000)孵育1 h,洗膜后显色曝光,在蛋白成像仪成像,条带用Image Lab 3.0软件进行图像分析,并计算目的蛋白与内参蛋白条带的灰度值。

2.3.6 统计学分析 采用SPSS 23.0软件对实验数据进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。计量资料采用独立样本 t 检验进行分析,等级资料(腹泻评分)采用秩和检验, $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠一般情况 研究发现,正常组小鼠体质量在实验期间逐渐增加。与正常组比较,造模后模型组小鼠体质量逐渐下降;与模型组比较,高、低剂量葛根芩连汤三氯甲烷提取物和盐酸洛哌丁胺可在一定程度上减缓动物体质量的减少。具体实验数据见表1。

表1 葛根芩连汤三氯甲烷提取物对迟发性腹泻小鼠体质量的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 1 Effect of GQT chloroform extract on body weight of mice with delayed diarrhea ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	第1天	第4天	第6天	第8天	第9天
正常		24.66 \pm 2.02	27.16 \pm 3.08	28.17 \pm 2.41	28.95 \pm 3.74	29.41 \pm 3.76
模型		24.73 \pm 1.71	25.16 \pm 1.45	23.63 \pm 1.89 ²⁾	21.85 \pm 2.51 ²⁾	21.83 \pm 1.21 ²⁾
洛哌丁胺	0.000 4	23.21 \pm 2.32	25.36 \pm 3.02	22.11 \pm 2.83	22.05 \pm 1.68	22.83 \pm 2.05
葛根芩连汤三氯 甲烷提取物	2.3	23.90 \pm 2.31	26.51 \pm 2.09	24.41 \pm 2.66	23.77 \pm 4.44	24.58 \pm 3.69 ³⁾
	1.16	23.10 \pm 1.76 ¹⁾	24.82 \pm 1.63	24.44 \pm 2.79	23.88 \pm 3.83	23.71 \pm 3.54

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表2~5同)。

3.2 小鼠腹泻情况 与正常组比较,模型组小鼠在注射CPT-11第4天开始出现湿软稀便,随后腹泻症状逐渐加重,便质清稀,部分见脓血便,达到重度腹泻($P<0.01$);与模型组比较,洛哌丁胺组和葛根芩连汤三氯甲烷提取物高、低剂量组可缓解小鼠腹泻情况。对于小鼠结肠一般形态,正常组结肠壁厚薄适中,结肠黏膜皱襞清晰完整,无充血、溃疡等肉眼改变;与正常组比较,模型组结肠组织肠管扩张变粗,长度皱缩变短,结肠黏膜色红,充血水肿明显;与模型组比较,洛哌丁胺组和葛根芩连汤三氯甲烷提取物高、低剂量组肠管稍变粗,结肠黏膜淡红,偶见充血、水肿,结肠长度虽比正常组略短,但可显著抑制CPT-11所致结肠萎缩。见图1,表2。

3.3 对小鼠结肠组织病理形态学的影响 在光学显微镜下观察,正常组黏膜结构完整,基本无病变,细胞紧密排列,小鼠肠隐窝和绒毛清晰完整,胞核较清晰可见;与正常组比较,模型组结肠黏膜可见缺损、肿胀、出血及炎性渗出,大量隐窝结构破坏,细胞核形态不一,并伴有大量细胞炎性浸润;与模型组比较,洛哌丁胺组和葛根芩连汤三氯甲烷提取物高剂量组黏膜组织无异常,基本无病变,隐窝及绒毛结构正常,细胞排列正常;葛根芩连汤三氯甲



A. 正常组;B. 模型组;C. 洛哌丁胺组;D. 葛根芩连汤三氯甲烷提取物高剂量组;E. 葛根芩连汤三氯甲烷提取物低剂量组(图2~4同)

图1 葛根芩连汤三氯甲烷提取物缓解迟发性腹泻小鼠结肠的一般形态

Fig. 1 Colon morphology of mice with delayed diarrhea affected by GQT chloroform extract

烷提取物低剂量组可见黏膜层少量细胞脱落,细胞排列较规整,伴有少量炎症细胞浸润。在小鼠结肠组织损伤学评分中,模型组[(7.20±0.90)分]较正常组[(0±0)分]明显升高($P<0.01$);洛哌丁胺组[(5.15±0.85)分],葛根芩连汤三氯甲烷提取物高剂量组[(5.63±0.82)分],葛根芩连汤三氯甲烷提取物低剂量组[(5.78±0.90)分]较模型组明显降低($P<0.05$)。见图2。

表2 葛根芩连汤三氯甲烷提取物对迟发性腹泻小鼠腹泻指数的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 2 Effect of GQT chloroform extract on diarrhea indexes of mice with delayed diarrhea ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	第1天	第4天	第6天	第8天
正常		0.15±0.02	0.16±0.02	0.15±0.04	0.16±0.03
模型		0.16±0.02	0.41±0.06 ²⁾	1.25±0.16 ²⁾	1.72±0.13 ²⁾
洛哌丁胺	0.000 4	0.15±0.03	0.37±0.04	1.10±0.10 ³⁾	0.88±0.07 ⁴⁾
葛根芩连汤三氯 甲烷提取物	2.3	0.14±0.02	0.34±0.03 ⁴⁾	1.18±0.04	0.99±0.08 ⁴⁾
	1.16	0.15±0.05	0.36±0.03 ³⁾	1.24±0.08	1.21±0.13 ⁴⁾

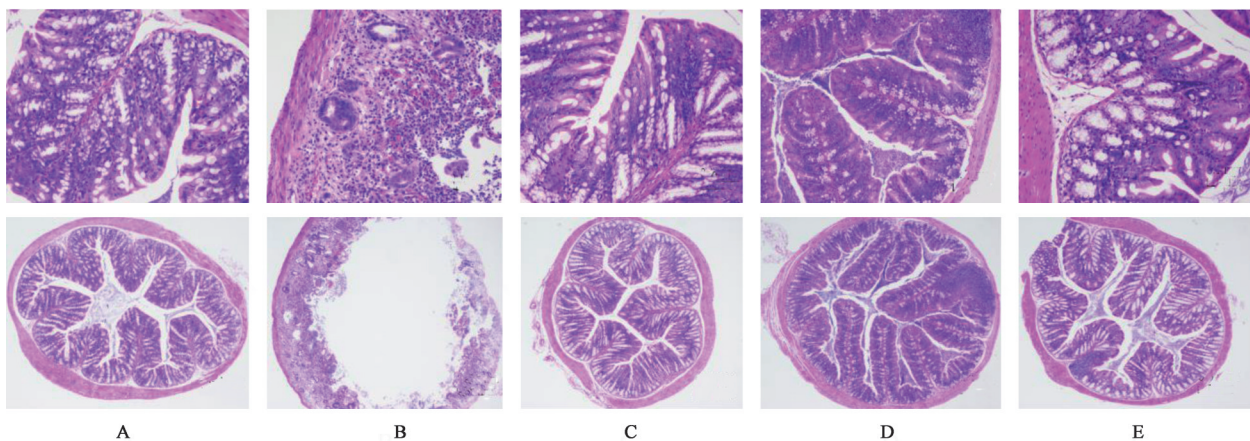


图2 葛根芩连汤三氯甲烷提取物对各组小鼠结肠组织病理学的影响(HE,×200,×40)

Fig. 2 Effects of GQT chloroform extract on pathological changes in mouse colon tissues of each group (HE,×200,×40)

3.4 对小鼠结肠组织 TNF- α , IL-1 β , COX-2 和 ICAM-1 含量的影响 与正常组比较,模型组 TNF- α , IL-1 β , COX-2, ICAM-1 的表达均显著升高 ($P <$

0.01)。与模型组比较,洛哌丁胺组和葛根芩连汤三氯甲烷提取物高、低剂量组 TNF- α , IL-1 β , COX-2, ICAM-1 的含量均显著降低 ($P <$ 0.01)。见表3。

表3 葛根芩连汤三氯甲烷提取物对小鼠结肠组织 TNF- α , IL-1 β , COX-2 和 ICAM-1 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 3 Effect of GQT chloroform extract on TNF- α , IL-1 β , COX-2 and ICAM-1 levels in colon tissues of mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	IL-1 β /ng·L ⁻¹	COX-2/U·L ⁻¹	ICAM-1/ μ g·L ⁻¹
正常		65.75 \pm 3.18	72.80 \pm 5.50	110.27 \pm 8.81	194.25 \pm 24.38
模型		96.30 \pm 6.15 ²⁾	104.59 \pm 15.58 ²⁾	151.96 \pm 15.29 ²⁾	261.19 \pm 19.01 ²⁾
洛哌丁胺	0.000 4	64.18 \pm 8.78 ⁴⁾	76.31 \pm 5.23 ⁴⁾	113.68 \pm 9.91 ⁴⁾	207.51 \pm 13.40 ⁴⁾
葛根芩连汤三氯 甲烷提取物	2.3	72.57 \pm 7.58 ⁴⁾	70.90 \pm 10.32 ⁴⁾	110.63 \pm 6.86 ⁴⁾	192.25 \pm 38.32 ⁴⁾
	1.16	78.03 \pm 9.78 ⁴⁾	82.53 \pm 10.63 ⁴⁾	130.57 \pm 9.10 ⁴⁾	225.73 \pm 7.79 ⁴⁾

3.5 对结肠 GSH-Px, SOD, MDA 和 NO 水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠结肠组织中 GSH-Px 及 SOD 的表达显著降低 ($P <$ 0.01), MDA 及 NO 的表达显著升高 ($P <$ 0.01)。与模型组比较,洛哌丁胺组和葛根芩连汤三氯甲烷提取物高、低剂量组小

鼠结肠组织中 GSH-Px 和 SOD 水平均显著上升 ($P <$ 0.01), MDA 含量均显著下降 ($P <$ 0.01); 洛哌丁胺组和葛根芩连汤三氯甲烷提取物高剂量组小鼠结肠组织中 NO 含量均显著下降 ($P <$ 0.01), 葛根芩连汤三氯甲烷提取物低剂量组则无明显差异。见表4。

表4 葛根芩连汤三氯甲烷提取物对小鼠结肠组织 GSH-Px, SOD, MDA 和 NO 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 4 Effect of GQT chloroform extract on GSH-Px, SOD, MDA and NO levels in colon tissues of mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GSH-Px/U·L ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	MDA/ μ mol·L ⁻¹	NO/ μ mol·L ⁻¹
正常		171.19 \pm 13.66	237.33 \pm 17.83	11.62 \pm 1.51	15.68 \pm 3.27
模型		100.84 \pm 23.60 ²⁾	123.44 \pm 25.90 ²⁾	19.32 \pm 2.27 ²⁾	28.53 \pm 3.30 ²⁾
洛哌丁胺	0.000 4	168.08 \pm 27.33 ⁴⁾	226.28 \pm 9.53 ⁴⁾	14.35 \pm 2.52 ⁴⁾	18.26 \pm 1.58 ⁴⁾
葛根芩连汤三氯 甲烷提取物	2.3	170.64 \pm 17.31 ⁴⁾	209.78 \pm 18.09 ⁴⁾	13.65 \pm 1.61 ⁴⁾	18.17 \pm 2.49 ⁴⁾
	1.16	174.70 \pm 14.79 ⁴⁾	150.74 \pm 16.06 ⁴⁾	15.21 \pm 1.72 ⁴⁾	27.14 \pm 3.42

3.6 对结肠 Keap1, Nrf2, HO-1, ZO-1 和 Occludin 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组的 Keap1, Nrf2, HO-1, ZO-1 及 Occludin 蛋白表达量均显著降低 ($P <$ 0.01)。与模型组比较,洛哌丁胺组和葛根芩连汤三氯甲烷提取物高剂量组 Keap1 蛋白表达显著升高 ($P <$ 0.01); 洛哌丁胺组和葛根芩连汤三氯甲烷提取物高、低剂量组 Nrf2, HO-1, Occludin, ZO-1 蛋白表达显著升高 ($P <$ 0.01)。见图3, 4 和表5。

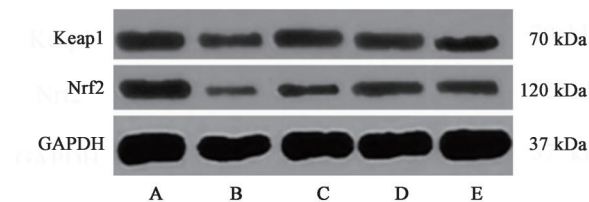


图3 各组小鼠结肠组织 Keap1 和 Nrf2 蛋白表达的电泳分析
Fig. 3 Electrophoresis of Keap1 and Nrf2 protein expression in colon tissues of mice

4 讨论

目前,临床对于 CPT-11 引起的迟发性腹泻暂无

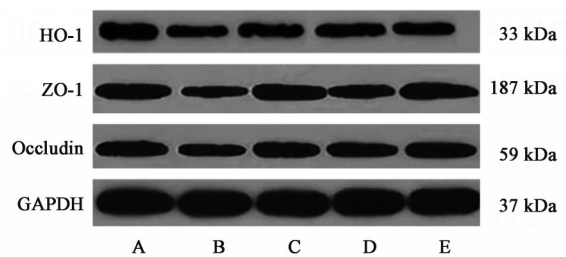


图4 各组小鼠结肠组织 HO-1, ZO-1 和 Occludin 蛋白表达的电泳分析
Fig. 4 Electrophoresis of HO-1, ZO-1 and Occludin protein expression in colon tissues of mice

Fig. 4 Electrophoresis of HO-1, ZO-1 and Occludin protein expression in colon tissues of mice

有效药物,多以止泻药或阿托品、东莨菪碱等进行控制,但易造成不良反应。研究者普遍认为,CPT-11 所致迟发性腹泻主要发生机制是药物在体内经羧酸酯酶转化为活性代谢产物7-乙基-10-羟基喜树碱(SN-38),并在肠道内累积,其活性比 CPT-11 强 100~1 000 倍,SN-38 在肠道内的浓度及其与肠道上皮接触的时间是导致迟发性腹泻的关键,可以改变肠道结构及功能,产生胃肠道毒性^[22]。而中医药对

表 5 葛根芩连汤三氯甲烷提取物对小鼠结肠组织 Keap1, Nrf2, HO-1, ZO-1 和 Occludin 蛋白表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 5 Effect of GQT chloroform extract on Keap1, Nrf2, HO-1, ZO-1 and Occludin protein expression in mouse colon tissues of each group ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Keap1/GAPDH	Nrf2/GAPDH	HO-1/GAPDH	ZO-1/GAPDH	Occludin/GAPDH
正常		0.74±0.13	0.88±0.08	0.90±0.03	0.69±0.11	0.74±0.03
模型		0.45±0.13 ²⁾	0.32±0.11 ²⁾	0.56±0.08 ²⁾	0.42±0.02 ²⁾	0.43±0.06 ²⁾
洛哌丁胺	0.000 4	0.67±0.12 ⁴⁾	0.64±0.10 ⁴⁾	0.72±0.02 ⁴⁾	0.61±0.05 ⁴⁾	0.65±0.08 ⁴⁾
葛根芩连汤三氯 甲烷提取物	2.3	0.58±0.06 ⁴⁾	0.69±0.14 ⁴⁾	0.67±0.10 ⁴⁾	0.51±0.04 ⁴⁾	0.62±0.04 ⁴⁾
	1.16	0.55±0.14	0.62±0.04 ⁴⁾	0.65±0.03 ⁴⁾	0.56±0.07 ⁴⁾	0.63±0.06 ⁴⁾

CPT-11 所致迟发性腹泻显示出了较好的防治作用, 如生姜泻心汤^[23]通过上调大鼠肠上皮细胞内 G 蛋白偶联受体 5 (Lgr5), 白细胞分化抗原 44 (CD44) mRNA, 降低半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 的活性以治疗 CPT-11 所致迟发性腹泻; 小柴胡汤^[24]通过降低肠道中 TNF- α , COX-2, IL-1 β 等减轻 CPT-11 肠毒性作用, PHY906^[7,25]通过促进隐窝细胞的增殖以再生祖细胞或干细胞恢复肠道损伤, 还可通过 TNF- α 诱导核转录因子- κ B (NF- κ B) 介导的转录活性及 COX-2 等多个作用位点抑制炎症反应的多个过程, 从而降低 CPT-11 引发的肠道毒性。因此, 研究防治 CPT-11 所致迟发性腹泻的中药具有重大意义。

本实验持续给予小鼠腹腔注射 CPT-11 4 d, 结果显示小鼠迟发性腹泻率达 100%, 说明复制迟发性腹泻模型成功。根据迟发性腹泻的临床表征, 该病归属于中医“泄泻”“下利”“肠痈”“肠癖”等范畴, 易耗伤阳气, 损伤脾胃, 进而导致脾失健运, 胃失和降, 升降功能失调, 水谷不化, 流注大肠。本文研究发现, 与模型组比较, 葛根芩连汤三氯甲烷提取物高、低剂量组可明显降低小鼠腹泻程度, 小鼠体质量变化也得到一定程度改善。同时, HE 染色显示, 模型小鼠给予高剂量葛根芩连汤三氯甲烷提取物后可缓解结肠损伤, 黏膜组织无异常, 基本无病变。

目前, 在防治迟发性腹泻的药物中, 细胞因子调节剂占据一定的地位, 如 TNF- α , IL-1 β 等细胞因子已被证实可刺激诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的表达从而损伤肠道组织; 高浓度的 NO 是抑制性神经递质, 会破坏线粒体呼吸, 且易造成肠屏障功能伤害和损伤^[26]; 与 CPT-11 联用于缓解肠毒性的沙利度胺^[27]能够抑制肠道炎症细胞因子, 减轻肠上皮细胞凋亡, 进而降低腹泻的发生率。故本研究选择检测小鼠结肠组织的细胞因子的表达情况, 结果显示葛根芩连汤三氯甲烷提取物可有效抑制 TNF- α , COX-2, IL-1 β , ICAM-1 的表达, 提示其可通过调节炎症细胞因子来缓解 CPT-11 所致迟发性腹泻。

氧化应激是指机体遭受有害刺激时, 会产生大量高活性分子如活性氧自由基和活性氮自由基, 导致氧化系统与抗氧化系统动态失衡, 进而导致组织损伤; 其是众多疾病的病理基础^[28]。Keap1/Nrf2 信号通路被认为是细胞氧化应激中最关键的内源性信号通路^[29]。同时, 氧化应激是破坏紧密连接 (TJ) 进而影响肠黏膜屏障功能的重要因素^[30]。TJ 是肠上皮细胞重要组成部分, 可保护黏膜屏障, 防止肠腔内致病性抗原进入, 以避免引起炎症及免疫反应, 以防肠道受损^[31]。故本研究选择检测小鼠肠道组织氧化应激因子水平, 同时检测 TJ 相关蛋白的表达, 结果发现葛根芩连汤三氯甲烷提取物可通过抗氧化应激水平缓解 CPT-11 的肠道毒性。

综上所述, 采用葛根芩连汤三氯甲烷提取物可显著改善 CPT-11 所致的迟发性腹泻, 其机制可能通过调节炎症因子及抑制抗氧化应激相关蛋白的表达, 从而达到缓解腹泻的目的。基于本文研究结果, 后续还将根据 CPT-11 引发肠道毒性的特性, 选择动物体内羧酸酯酶和 SN-38 等的活性进行考察。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] ALIMONTI A, GELIBTER A, PAVESE I, et al. New approaches to prevent intestinal toxicity of irinotecan-based regimens[J]. Cancer Treat Rev, 2004, 30(6): 555-562.
- [2] TANG L, LI X L, WAN L P, et al. Herbal medicines for irinotecan-induced diarrhea[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 182.
- [3] MEGO M, CHOVANEC J, ANDREZALOVA I, et al. Prevention of irinotecan induced diarrhea by probiotics: A randomized double blind, placebo controlled pilot study [J]. Complement Ther Med, 2015, 23(3): 356-362.
- [4] STEIN A, VOIGT W, JORDAN K. Chemotherapy-induced diarrhea: pathophysiology, frequency and guideline-based management [J]. Ther Adv Med

- Oncol, 2010, 2(1): 51-63.
- [5] LI J, LU M, LU Z H, et al. Irinotecan plus cisplatin followed by octreotide long-acting release maintenance treatment in advanced gastroenteropancreatic neuroendocrine carcinoma: IPO-NEC study [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(15): 25669-25678.
- [6] ZHANG L, JIN Y Y, PENG J, et al. Qingjie Fuzheng granule attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucosal damage [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109223.
- [7] LAM W, BUSSOM S, GUAN F, et al. The four-herb Chinese medicine PHY906 reduces chemotherapy-induced gastrointestinal toxicity [J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2(45): 45-59.
- [8] 陈丽红, 唐于平, 王强. 葛根芩连汤的现代研究进展 [J]. *中草药*, 2010, 41(4): 676-680.
- [9] 续畅, 钟萌, 马致洁, 等. 葛根芩连汤的现代研究进展 [J]. *吉林中医药*, 2015, 35(6): 629-632.
- [10] 刘昌顺, 晋臻, 陈飞龙, 等. 葛根芩连汤中 14 种功效成分在大鼠体内的组织分布 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(10): 93-101.
- [11] 李慧敏, 张龙基, 万惠萍, 等. 葛根芩连汤灌肠结合针灸治疗腹泻型肠易激综合征的疗效观察 [J]. *中国肛肠病杂志*, 2020, 40(2): 32-34.
- [12] 赵学顺, 彭桂华. 葛根芩连汤加减中药免煎颗粒与传统饮片治疗细菌性痢疾的对照观察实践思考 [J]. *临床医药文献电子杂志*, 2017, 4(70): 13790.
- [13] WU Y H, WANG D, YANG X Q, et al. Traditional Chinese medicine Gegen Qinlian decoction ameliorates irinotecan chemotherapy-induced gut toxicity in mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 2252-2261.
- [14] 刘宇政, 章军, 王跃生, 等. 葛根芩连汤剂量相关问题探讨 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(16): 216-218.
- [15] 郝万山. 汉代度量衡制和经方药量的换算 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2005, 3(3): 48-51.
- [16] 全小林, 穆兰澄, 姬航宇, 等. 《伤寒论》药物剂量考 [J]. *中医杂志*, 2009, 50(4): 368-372.
- [17] 杜茂波. 《伤寒论》药物剂量问题探讨 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(22): 5012-5016.
- [18] 陈士林. 中药饮片标准汤剂: 第一卷 [M]. 北京: 科学出版社, 2017: 7-10.
- [19] MELO M L P, BRITO G A C, SOARES R C, et al. Role of cytokines (TNF- α , IL-1 β and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008, 61(5): 775-784.
- [20] DARSIGNY M, ST-JEAN S, BOUDREAU F. Cux1 transcription factor is induced in inflammatory bowel disease and protects against experimental colitis [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2010, 16(10): 1739-1750.
- [21] WALLACE B D, WANG H W, LANE K T, et al. Alleviating cancer drug toxicity by inhibiting a bacterial enzyme [J]. *Science*, 2010, 330(6005): 831-835.
- [22] SANTI D V, SCHNEIDER E L, ASHLEY G W. Macromolecular prodrug that provides the irinotecan (CPT-11) active-metabolite SN-38 with ultralong half-life, low C(max), and low glucuronide formation [J]. *J Med Chem*, 2014, 57(6): 2303-2314.
- [23] DENG C, DENG B, JIA L Q, et al. Preventive effects of a Chinese herbal formula, Shengjiang Xiexin decoction, on irinotecan-induced delayed-onset diarrhea in rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 7350251.
- [24] 胡培. 小柴胡汤对伊立替康体内代谢的影响及肠道保护作用 [D]. 咸宁: 湖北科技学院, 2018.
- [25] LAM W, JIANG Z L, GUAN F L, et al. The number of intestinal bacteria is not critical for the enhancement of antitumor activity and reduction of intestinal toxicity of irinotecan by the Chinese herbal medicine PHY906 (KD018) [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 490.
- [26] ALVARENGA E M, SOUZA L K M, ARAUJO T S L, et al. Carvacrol reduces irinotecan-induced intestinal mucositis through inhibition of inflammation and oxidative damage via TRPA1 receptor activation [J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 260: 129-140.
- [27] 甘琴. 沙利度胺预防伊立替康迟发性腹泻的效果 [J]. *中国药物经济学*, 2015, 10(5): 39-40.
- [28] CHENG Y J, ZAN J Y, SONG Y Y, et al. Evaluation of intestinal injury, inflammatory response and oxidative stress following intracerebral hemorrhage in mice [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(4): 2120-2128.
- [29] MENG H X, GUO J H, WANG H F, et al. Erythropoietin activates Keap1-Nrf2/ARE pathway in rat brain after ischemia [J]. *Int J Neurosci*, 2014, 124(5): 362-368.
- [30] SUZUKI T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(4): 631-659.
- [31] WARDILL H R, BOWEN J M, AL-DASOOQI N, et al. Irinotecan disrupts tight junction proteins within the gut: implications for chemotherapy-induced gut toxicity [J]. *Cancer Biol Ther*, 2014, 15(2): 236-244.

[责任编辑 刘德文]